





87

PHARMACEUTICAL CONTROL OF INFLAMMATION**Publication number:** JP10506388 (T)**Publication date:** 1998-06-23**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:****- international:**

A61K9/06; A61K9/08; A61K31/00; A61K31/195; A61K31/40;
A61K31/55; A61K31/557; A61K33/26; A61K45/00; A61P1/00;
A61P11/00; A61P11/08; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00;
A61K9/06; A61K9/08; A61K31/00; A61K31/185; A61K31/40;
A61K31/55; A61K31/557; A61K33/26; A61K45/00; A61P1/00;
A61P11/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P37/00; (IPC1-
7): A61K45/00; A61K9/06; A61K9/08; A61K31/55; A61K31/557;
A61K45/00

- European:

A61K31/714; A61K31/00; A61K31/195; A61K31/40;
A61K31/557; A61K33/26

Application number: JP19950510696T 19950922**Priority number(s):** CA19942132690 19940922; WO1995GB02249 19950922**Also published as:** WO9609038 (A2) WO9609038 (A3) PT782441 (E) NZ292963 (A) ES2192205 (T3)

more >>

Abstract not available for JP 10506388 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9609038 (A2)**

Control of inflammation is achieved by control of the level and/or activity of the enzyme heme-oxygenase (HO). A HO inducer is anti-inflammatory (figure 14) and used to treat inflammation, such as chronic inflammatory diseases. A HO inhibitor promotes inflammation and is used to treat immunosuppressed conditions. Alternative, or additional, control of heme-oxygenase activity is achieved by control of nitric oxide levels, elevated levels promoting inflammation.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-506388

(43) 公表日 平成10年(1998) 6月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
A 6 1 K 45/00	ABE	A 6 1 K 45/00	ABE
9/06	ABA	9/06	ABAG
9/08	AAB	9/08	AABF
31/55	ACJ	31/55	ACJ
31/557	ABG	31/557	ABG
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-510696	(71) 出願人	ウィリアム ハーベイ リサーチ リミテッド
(86) (22) 出願日	平成7年(1995) 9月22日		イギリス国 イーシー1エム 6ビーキュー
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 3月24日		ー ロンドン, チャーターハウス スクウェア (番地なし), セイント パーソロ
(86) 国際出願番号	PCT/GB95/02249		ミュウ アンド ザ ロイヤル ロンドン
(87) 国際公開番号	WO96/09038		ホスピタル スクール オブ メディシ
(87) 国際公開日	平成8年(1996) 3月28日		ン アンド デンティストリー
(31) 優先権主張番号	2, 132, 690	(72) 発明者	ウィリス, ディーン
(32) 優先日	1994年9月22日		イギリス国 シーブイ9 1エイチキュー
(33) 優先権主張国	カナダ (CA)		ワーウィックシャー, アザーストーン,
			クロフト ロード 16
		(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症の薬学的制御

(57) 【要約】

酵素ヘム-オキシゲナーゼ (HO) のレベルおよび/または活性の制御によって炎症の制御が達成される。HO誘導物質は抗炎症性であり (図14)、そして慢性炎症性疾患のような炎症を処置するために使用される。HO阻害剤は、炎症を促進し、そして免疫抑制状態を処置するために使用される。ヘム-オキシゲナーゼ活性の別の制御またはさらなる制御は、一酸化窒素レベル (上昇したレベルは炎症を促進する) の制御によって達成される。

【特許請求の範囲】

1. 炎症の制御のための医薬の製造における、哺乳動物におけるヘム・オキシゲナーゼの活性または量を変更する化合物の使用。
2. 炎症の処置のための化合物の製造における、ヘム・オキシゲナーゼ活性を増大させる化合物の、請求項1に記載の使用。
3. ヘム・オキシゲナーゼを誘導する化合物の、請求項2に記載の使用。
4. 一酸化窒素レベルを低下させる化合物の、請求項2に記載の使用。
5. 一酸化窒素合成酵素阻害剤の、請求項4に記載の使用。
6. 炎症を処置するための薬学的組成物であって、該組成物はヘム・オキシゲナーゼ活性を増大させる化合物を含有し、ここで、該組成物は、錠剤、丸剤、水性溶液中での懸濁用の散剤、水性溶液中での溶解用の散剤、油、ワックス、ゲル、クリームまたは乳剤をさらに含有する局所製剤の形態であるか、あるいは注射用の滅菌水性溶液である、薬学的組成物。
7. Aシリーズのプロスタグランジン；プロスタグランジンA受容体のアゴニスト；ビタミンB₁₂；ヘミン；およびヘム・オキシゲナーゼ誘導活性を保持するヘミンのフラグメント、サブユニット、コンジュゲート、アナログ、誘導体または複合体から選択されるヘム・オキシゲナーゼ活性を増大させる化合物を含む、請求項6に記載の薬学的組成物。
8. さらに味覚増強剤を含み、そして経口投与用である、請求項6または7に記載の薬学的組成物。
9. 慢性炎症の処置のための医薬の製造における、ヘム・オキシゲナーゼ活性を増大させる化合物の使用。
10. 慢性関節リウマチ、慢性炎症性腸疾患、多発性硬化症、喘息、気道炎症性疾患、腱炎、および脳における慢性炎症から選択される疾患の処置のための医薬の製造におけるヘム・オキシゲナーゼ活性を増大させる化合物の使用。
11. 炎症反応を刺激するための医薬の製造における、ヘム・オキシゲナーゼ活性を低下させる化合物の、請求項1に記載の使用。
12. ヘム・オキシゲナーゼ阻害剤の、請求項11に記載の使用。

13. 前記ヘムオキシゲナーゼ阻害剤がFePPのアナログである、請求項12に記載の使用。

14. 前記アナログが、SnPP、SnMP、SnDPP、CrPP、CrMP、CrDPP、ZnPP、ZnMP、ZnDPP、MnPP、MnMP、MnDPPから選択され、ここで、PPはプロトポルフィリンに等しく、MPはメソポルフィリンに等しく、そしてDPPはジヨードジューテロポルフィリンに等しい、請求項13に記載の使用。

15. 一酸化窒素レベルを増加させる化合物の、請求項11に記載の使用。

16. 免疫抑制の処置のための医薬の製造における、請求項11～15のいずれか1つに記載の使用。

17. AIDSの処置のための医薬の製造における、請求項16に記載の使用。

18. 単核細胞の刺激のための医薬の製造における、請求項11～17のいずれか1つに記載の使用。

19. 一酸化窒素のレベルを増大させる化合物を含む、薬学的組成物。

20. 一酸化窒素合成酵素の基質または一酸化窒素ドナーを含む、請求項19に記載の薬学的組成物。

21. ヘムオキシゲナーゼの活性を変更する薬学的組成物を投与する工程を包含する、患者における炎症を制御する方法。

22. ヘムオキシゲナーゼ活性を増大させるか、あるいはヘムオキシゲナーゼのレベルを増大させる化合物を投与する工程を包含する、炎症を弱めるための、請求項21に記載の方法。

23. ヘムオキシゲナーゼ誘導物質を投与する工程を包含する、請求項22に記載の方法。

24. プロスタグランジンA受容体アゴニストを投与する工程を包含する、請求項21または請求項22に記載の方法。

25. ヘムオキシゲナーゼ活性を低下させる化合物を投与する工程を包含する、炎症反応を刺激するための、請求項21に記載の方法。

26. 一酸化窒素のレベルを増大させる化合物を投与する工程を包含する、請求項25に記載の方法。

27. ヘム-オキシゲナーゼ阻害剤を投与する工程を包含する、請求項25に記載の方法。

28. FePPのアナログを投与する工程を包含し、ここで該アナログがヘム-オキシゲナーゼを阻害する、請求項27に記載の方法。

29. AIDSにおいて観察されるような免疫抑制の処置のための、請求項25～28のいずれか1つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

炎症の薬学的制御

本発明は、炎症反応の制御、炎症を阻害または低下させる医薬、炎症を促進、誘導または増大させる医薬、および炎症を阻害または促進することによる疾病状態の処置に関する。詳細には、本発明は、体内のヘム・オキシゲナーゼの活性または量の制御、あるいは活性および量双方の制御に関する。

本発明は、他の適用に加えて、喘息においてのような過敏症反応を患うヒト、ROS(反応性酸素種(Reactive Oxygen Species))が再灌流損傷およびアテローム性動脈硬化症のような病理学的役割を有する疾患を患うヒト、および薬物処置またはAIDSのような病理学に由来する免疫抑制状態を有するヒトにおいて、炎症反応によって発現されるかまたは増悪される病気の処置(慢性炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチの処置におけるように)における特定の適用を有する。

慢性炎症性疾患は、多くの国の財力に対して重篤な社会的かつ経済的な負担をかけるが、安全かつ効果的な処置の数は限られている。現在までのところ、主要な研究努力は病理学的プロセスの開始および維持の原因となるメディエーターに集中している。対照的に、炎症の消散の原因となる内因性因子には焦点が当てられてこなかった。

主要な抗炎症性薬学的薬剤はグルココルチコイドおよび非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)である。共によくカタログに記載されている不利に悩んでおり、事実、英国で報告されている薬物の有害な反応のほとんど1/4はNSAIDによるものである。NSAIDの副作用は通常胃腸管に影響し、そして肝臓、腎臓、脾臓、血液および骨髄にも影響する。NSAIDはいくつかの慢性炎症性疾患の処置では効果的でない。

グルココルチコイドは強力な抗炎症剤であり、炎症の急性期および慢性期を共に抑制する。しかしながら、それらは、免疫応答も抑制し、そして多くの局面の必須細胞修復プロセスを減少させ得るという害を有する。一般に、それらは注射によって投与しなければならず、そして経口投与では効果的でない。

従って、経口投与でき、かつ慢性炎症に対して効果的なさらなる抗炎症薬に対

する継続的必要性がある。

逆に、炎症反応の有意な抑制がある多数の病気が知られている。1つの例は後天性免疫不全症候群（AIDS）であり、そこではHIVによる感染は、典型的には、感染した人は別の日和見性感染、しばしば、健康な人では稀にしか致死的ではない細菌またはウイルスの感染で死亡するという免疫抑制に導く。この場合における炎症の刺激または誘導はHIV以外の感染による死亡の防止を助け得る。しかしながら、このプロ炎症の(pro-inflammatory)目的のための適切な医薬は知られていない。

ヘム（フェリープロトポルフィリンIX）は細胞代謝で重要な役割を演じ、ヘムタンパク質（例えば、ヘモグロビンおよびチトクローム）の補欠分子団として機能する。その異化作用は2段階のプロセスを有する。最初の、かつ律速の反応はミクロソーム酵素ヘム-オキシゲナーゼによるビリベルジンおよび一酸化炭素の生成である。第2の過程はサイトソルの酵素ビリベルジンレダクターゼによるビリベルジンからのビリルビンの生成である。

ヘム-オキシゲナーゼは肝臓、腎臓、脾臓および皮膚で見い出されており、そしてまた特定の細胞型、特に繊維芽細胞およびマクロファージにも局在している。この酵素は少なくとも2つのイソ型で存在し、一方は構成的、そして他方は誘導可能である。ヘム、重金属イオン（例えば、スズ、金、白金および水銀）および遷移金属イオン（例えば、鉄、コバルト、クロムおよびニッケル）はすべてヘム-オキシゲナーゼを誘導できる。加えて、ヘム-オキシゲナーゼは熱ショック（従って、別名は熱-ショックタンパク質32:hsp32）、酸化的ストレスおよびインターロイキン-1（IL-1）、腫瘍壊死因子およびIL-6のようなサイトカインのような刺激に対する汎発性ストレス反応の一部として誘導される。ストレス反応は、無防備な細胞酵素を不活化から保護する結果となる点で有益と観察されている。

動物胆汁は気管支炎、喘息および他の過敏症反応の処置において数世紀の間伝統的な中国医薬で使用されてきた。より最近では、ビリベルジンおよびビリルビンは、プロテアーゼ阻害剤の不活化、ヒアルロン酸の血管形成フラグメントへの

解重合および内因性抗原を生起するタンパク質の改変を含む、一定範囲のプロ炎症作用を有し得る反応性酸素種（ROS）を除去することが示されてきた。

Abrahamら、Int. J. Biochem. 20(6):543-558(1988)は、ヘム・オキシゲナーゼ、ならびに内因性および外因性因子によるその活性の調節を含めた哺乳動物生理学におけるその役割の一般的レビューを提供している。ヘム・オキシゲナーゼ活性の誘導における重金属イオンの役割と同様、この酵素とNADPH-チトクロムP450レダクターゼとの相互作用が議論されている。金属ポリフィリンは阻害剤として教示されている。この文献の第548頁において、著者は、

「一般に、細胞はストレス下または疾病状態にある場合、ヘム・オキシゲナーゼ活性は増大する。事実、この酵素は異常の発生を知らせる赤信号と見なすことができる」

と述べている。

Sacerdotiら、Science 243:388-390(1-20-89)は、高血圧は腎臓チトクロムP450レベルに関連しており、そしてその酵素はヘム・オキシゲナーゼ生成を誘導することによって枯渇され得ると主張している。これは Co^{2+} での処理によってなされた。

McCarty(Chemical Abstract, 100:1864024(1984))は、過敏症および炎症の顕著なメディエーターであると主張されているロイコトリエンの減少におけるセレンの効果を教示することを目的とする。McCartyは、事実、治療食アジュバントの経口投与を教示している。

米国特許第5102670号は、ヘム・オキシゲナーゼ誘導物質を個人の腫れた目に投与して、ヘム・オキシゲナーゼ生成を増大させ、目に存在する12(R)ヒドロキシエイコサテトラエン酸（12(R)-HETE）ならびにやはり目に存在する12(R)ジヒドロキシエイコサトリエン酸（12(R)-DIHETE）の量を減少させることによる目の腫脹の減少に関する。角結膜(corneoconjunctival)腫脹を減少させるためにこの特許に提示されたスキームは、従って、主として目に見い出されるアラキドン酸代謝産物12(R)HETEおよび12(R)DIHETEの減少による。詳細には、治療効果は主として血液房水関門（目以外では観察されていないバリア）の維持によると説明されている。従って、この特許におけるこの教示は目だけに關し、そして他の適用

可能性はほとんど有していない。

ほぼ同期間の間に、ロックフェラー大学、Drummond, N.Y.のMessrs. George S. DrummondおよびHallah Kappasは、ヘムオキシゲナーゼに関する研究と一緒に、および他の者と共に関与した。研究の結果は、米国特許第4657902号；同第4699903号；同第4684637号；同第5010073号および同第5223494号で少なくとも一部は具体化されたようである。

米国特許第4657902号は、哺乳動物においてヘム代謝を阻害し、哺乳動物においてトリプトファン代謝の速度を制御し、そしてヘムが哺乳動物から排出される速度を増大させるための、新規化合物スズメソポルフィリンおよびそれを含有する組成物の使用を教示することを目的とする。

この特許の開示は、第1欄、22～36行に以下のように、

「哺乳動物および他の脊椎動物において、ヘムはヘムオキシゲナーゼによって酸化的に分解されて、開鎖(open chain)のテトラピロールビリベルジンを形成する。哺乳動物では、ビリベルジンはビリベルジンレダクターゼによってビリルビンに還元される。肝臓において、ビリルビンは、その排出に先立って、肝グルクロニルトランスフェラーゼ系によってモノーおよびジーグルクロニドコンジュゲートに変換される。

ビリルビンは毒性化合物であるが、通常は、この毒性は、ビリルビンが迅速に血漿タンパク質に結合され、肝臓に輸送され、コンジュゲート化され、排出されるので発現されない。しかしながら、新生児においては、望ましくない高濃度のビリルビンが血清に存在し、そして神経毒性を生じ得る。「核黄疸」として知られる難治性神経学的症候群は最も重篤なビリルビン毒性の発現である。」

と記載している。

従って、発明者らは、第3欄、43～48行において、

「今回、化合物Sn（スズ）メソポルフィリン（SnMP）が、ヘム代謝速度を低下させ、ヘムが排出される速度を増加させ、そして肝臓におけるトリプトファン代謝の速度を制御するためのこのような処置を要するヒトを含めた哺乳動物の処置に使用され得ることを見出した。」

と記載している。

米国特許第4699903号は、スズジヨードジュテロポルフィリンを投与することによってヘムの処分を増大する必要を有する哺乳動物によって、ヘムが排出される速度を増加させる方法を教示することを目的とする。

米国特許第4684637号は、スズもしくはクロムプロトポルフィリンIXの投与による哺乳動物におけるヘムの代謝速度を低下させるための代謝速度低下方法を開示している。

米国特許第5010073号は、脾臓におけるヘム-オキシゲナーゼ活性の阻害のために脾臓を標的化するためのリボソームメタロポルフィリン調製物に関することを目的とする。

米国特許第5223494号は、このような防止が必要な動物による食物からの鉄の吸収を低下させるためにメソポルフィリンを投与することによって、腸におけるヘム-オキシゲナーゼ活性を阻害するため方法を教示することを目的とする。

この後者の群の特許は、特定の目的で身体組織（例えば、脾臓または腸）を標的化することによる、選択された身体組織におけるヘム-オキシゲナーゼの阻害に関する。

熱ショックタンパク質（HSP）またはストレスタンパク質は、生物圏において最も高度に保存されかつ豊富なタンパク質の中にある一群のタンパク質である。このタンパク質のイソ型の多くは通常の生理学的条件下で発現され、そして細胞内で重要な役割を果たすが、それらは、細胞の完全性を脅かす因子によって大いに上昇調節（upregulate）される。これらの因子は、熱および冷ショック、酸素ラジカル、重金属、低酸素症、感染、エタノール、イオノフォアおよびチオール反応性剤を含む。細胞におけるHSP濃度のこの増加は、細胞を他の点では致死的な傷害に対して一時的に抵抗性とし、そしていくつかの生物学的メディエーターに対して細胞の感受性を鈍くする。

病理学的疾患におけるHSPの役割は、かなりの注目をひいてきた。HSPに対する免疫応答は、その広範な種間のアミノ酸相同性のため、高度に交差反応的であり、そして自己反応的でさえあり得る。HSPに対する免疫応答は、既に、ラットにおけるアジュバント関節炎、マウスにおけるプリスタン関節炎、非肥満糖尿病マウスにおける真性糖尿病、慢性関節リウマチ、全身エリテマトーデス、アテロー

ム

性動脈硬化症および腫瘍サーベイランスと関係付けられている。従って、HSPは病理学的疾患において、ストレスの多い環境における細胞および組織に対する細胞保護作用を有するが、いくつかの自己免疫疾患において有害な免疫応答を誘導するという、逆説的な作用を有し得る。

酵素一酸化窒素合成酵素 (NOS EC 1.14.13.39) のイソ型によってL-アルギニンおよび分子酸素から形成される一酸化窒素 (NO) は、種々の生理学および病態生理学のプロセスに関与する。この分子の反応性および金属タンパク質と複合体化するその能力は、その多くの生物学的作用の基礎となる。例えば、血管平滑筋における含ヘム可溶性グアニル酸シクラーゼ (EC 4.6.1.2) のNOによる活性化の結果、血管調節が起こり、他方、宿主防御において、鉄-硫黄酵素の阻害は、侵入する病原体において代謝機能不全を引き起こす。

炎症は、血管作用性メディエーター、ケモアトラクタント、サイトカイン、プロスタグランジン、フリーラジカルおよびプロテアーゼを含む種々のメディエーターの一連の放出を含む。慢性関節リウマチ、慢性炎症性疾患においては、HSPは患者の滑膜の内層 (synovial lining) において上昇調節される。しかしながら、炎症におけるその役割は未だ完全には解明されていない。

本発明の目的は、炎症の制御（特に慢性炎症の処置、または免疫抑制状態の処置におけるような炎症反応の刺激）のための改良された（または少なくとも別の）手段を提供することである。

本発明者らは、今回、体内のヘム-オキシゲナーゼの量または活性あるいは量および活性の双方を制御することによって、（1）汎発性抗炎症作用または応答が得られるか（ここではヘム-オキシゲナーゼが誘導される）、あるいは（2）一般的炎症反応が得られる（ここではヘム-オキシゲナーゼが抑制（または阻害）される）ことを見出した。

本発明者らの発明の1つの局面によれば、ヘム-オキシゲナーゼを誘導するか、あるいはヘム-オキシゲナーゼの活性を刺激または増加させる化合物の投与によって炎症が処置される。この処置は全身性であるかまたは標的化でき、例えば

、ヒト体内の単球およびマクロファージで見い出された誘導性ヘム・オキシゲナーゼに対して標的化できる。この処置はヘム・オキシゲナーゼ生成を誘導し、および

び/またはその活性を刺激し；特異的医療適用は、慢性炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチの処置、喘息におけるような過敏症反応の処置、および損傷、アテローム性動脈硬化症および梗塞の処置を包含する。

本発明の実施態様において、薬学的組成物は、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせた、ヘム・オキシゲナーゼの活性を誘導、刺激または増大させる化合物を含む。この組成物は、注射用溶液、経口的に受容可能な組成物、または局所組成物の形態である。

適切な注射用溶液は、好ましくは、ほぼ生理学的濃度の生理食塩水を含有する滅菌した生理食塩水含有溶液を包含する。

経口投与には、この組成物は錠剤、丸剤あるいは水中での懸濁または水中での溶解のための散剤のような固体形態であり得る。このような固体組成物の調製は当業者に公知である。組成物の味をよりよくし、あるいは少なくとも口の不快さをより少なくするために、味覚増強剤(taste enhancing agent)を経口組成物に補充する選択がある。適切な味覚増強剤は、甘味剤、矯味剤、および医薬中の有効成分における不快または望まれないずれの味も隠すかまたは低下させる薬剤を含む。

局所組成物の場合には、キャリアは、好ましくは、適用後に組成物を適所に保持するのに適した非水性キャリアである。適切なキャリアは、クリーム、ゲル、ワックス、油および乳剤を包含する。

従って、本発明は、さらなる抗炎症薬を提供する。それは、選択された特定の化合物によって、経口投与で与えられ得、そして最初のテストは有用な抗炎症活性を示した。ヘム・オキシゲナーゼの生成物は炎症の進行において多数の効果を有し、他方、ほとんどのNSAIDによって標的化された酵素、シクロオキシゲナーゼの生成物は効果が少ないと考えられている。従って、本発明の組成物は、NSAIDで観察されたものよりも潜在的に強力な薬学的活性を呈する。

本発明の別の実施態様は、ヘム・オキシゲナーゼ誘導物質または刺激物質および薬学的に受容可能なキャリアを含む抗炎症組成物である。

本発明のさらなる実施態様は、炎症の処置用の医薬の製造における、ヘム・オキシゲナーゼの活性を誘導、刺激または増大させる化合物の使用である。

ヘム・オキシゲナーゼを誘導するのに適切な薬剤は、Aシリーズのプロスタグランジン；プロスタグランジンA受容体のアゴニストであるAシリーズのプロスタグランジンのアナログ、誘導体、複合体およびコンジュゲート；プロスタグランジンA受容体のアゴニスト；ビタミンB₁₂；ヘミン；およびヘム・オキシゲナーゼ阻害活性を保持するそのフラグメント、サブユニット、コンジュゲート、アナログ、誘導体および複合体を包含する。適切な投与量は、例えばヒトの体重1 kg当たり0.1~30 μ モルである。例えば、ヘミン (FePP) を用いる場合、適切な投与量は、体重1 kg当たり約0.06mgヘミン~約24mgヘミンである。

ヘム・オキシゲナーゼの誘導または活性化用の別の薬剤は、一酸化窒素合成を阻害または減少させる薬剤である。本発明者らは、一酸化窒素 (NO) レベルとヘム・オキシゲナーゼ活性との間の実質的な相互関係を発見し、そこでは、NOレベルを低下させた結果、HO活性が増加し、そして抗炎症性となる。従って、本発明の第1の局面の別の実施態様は、有効成分として、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の阻害剤のように、NOレベルを低下させる物質を含む薬学的組成物である。

本発明のなおさらなる実施態様によれば、患者の体内のヘム・オキシゲナーゼを誘導する（またはそのレベルを増加させる）方法が提供され、この方法は、患者において炎症反応を低下させるのに有効な投与量のヘム・オキシゲナーゼ誘導物質を投与する工程を含む。

本発明の特定の実施態様において、特に単球およびマクロファージで見い出された誘導性ヘム・オキシゲナーゼのように、単核細胞においてヘム・オキシゲナーゼを誘導または刺激することによって、炎症が処置される。これは、典型的には、炎症部位における大集団のこれらの細胞によって媒介され、そしてそれによって特徴付けられる慢性炎症を処置する場合に有益である。

本発明の別の実施態様により、ヒト体内において炎症反応を制御する方法が提

供され、この方法は有効投与量のヘムオキシゲナーゼ誘導物質の投与によって炎症反応を低下させる工程を含む。

好ましくは、この誘導物質は、任意の適切な様式（例えば、滅菌水、生理食塩水（滅菌））にて、適切な薬学的に受容可能なビヒクル中にて投与される。約pH 7と約pH 8との間のpHを有する緩衝化等張水性溶液が適切である。凍結乾燥製剤

も適切である。凍結乾燥製剤は滅菌水で再構成させることができる。

本発明の好ましい実施態様において、特に慢性炎症が処置される。本発明の第1の局面により処置され得る慢性炎症を含む疾患は、慢性炎症性関節疾患(chronic inflammatory joint disease)（例えば、慢性関節リウマチ）、慢性炎症性腸疾患（例えば、クローン病）、呼吸器系炎症性疾患（例えば、喘息）、脳の慢性炎症（例えば、多発性硬化症）、および柔組織の炎症（例えば、腱炎）を包含する。

本発明の別の実施態様によれば、一般にヒト体内において炎症反応を減少させる（炎症を処置する）方法が提供され、この方法は、ヘムオキシゲナーゼのHSP32イソ型の存在（発現）をモニターし、そして正常レベルより低く低下した場合、ヘムオキシゲナーゼ酵素の発現を増加させるのに有効な投与量のヘムオキシゲナーゼ誘導物質を投与して、それにより、炎症反応（炎症）を減少させる工程を含む。この誘導物質は、好ましくは、単球およびマクロファージに標的化される。

投与量は一定期間にわたって投与され得る。しかしながら、現在までに使用された化合物の効果は、各投与量の投与24時間後にピークとなり、投与48時間後に減退するようである。

処方物は（1回の投与のための）単位投与形態であり得るか、あるいは適切な投与量を取り出して使用できる多回処方組成物としてパッケージされ得る。例えば、バイアル中の溶液は、投与量を取り出して投与することができる多回処方組成物を提供し得る。本発明の最初の局面の組成物および使用は、所望により、（1）NSAID、および（2）NOS（一酸化窒素合成酵素）阻害剤のうちの一方または双方によって補足される。

本発明の第2の局面によれば、ヘム-オキシゲナーゼの阻害または抑制による炎症反応の刺激が提供される。第2の局面の実施態様において、炎症を刺激または増強するための薬学的組成物は、ヘム-オキシゲナーゼ阻害剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

表現「炎症を刺激する」および「炎症を増強する」は、炎症の少なくとも1つの特徴が刺激または増強されることを示すことが意図される；表現「炎症を抑制する」、「炎症を低下させる」およびすべてのこれらの表現の変形も同様である。

本発明の第2の局面による組成物を用いる免疫抑制の処置、例えば、AIDSの処置において、ヘム-オキシゲナーゼ阻害剤を投与して、単球および/またはマクロファージの活性を刺激する。これらの2つの細胞型は細菌およびウイルス感染と戦うのに非常に重要であり、従って、それらの活性を増大させることは、例えばAIDS罹患のための新規な療法を提供する。

ヘム-オキシゲナーゼ（例えば、単球およびマクロファージ中の誘導性ヘム-オキシゲナーゼ）を阻害するのに適切な薬剤は、典型的には、FePPのアナログ（注意：ヘム-オキシゲナーゼを誘導する）であり、ここで、Feイオンは、別の金属イオンによって置き換えられるか、あるいはPPが置き換えられる。例として：

SnPP SnMP SnDPP CrPP CrMP CrDPP

ZnPP ZnMP ZnDPP MnPP MnMP MnDPP

があり、ここで、Sn=スズ、Cr=クロム、Zn=亜鉛、Mn=マンガン、PP=プロトポルフィリン、MP=メソポルフィリンおよびDPP=ジヨードジューテロポルフィリンである。

これらの薬剤の適切な投与量は、例えばヒトの体重1kg当たり0.1~50 μ モルの範囲である。例えば、プロトポルフィリン（SnPP）を用いる場合、SnPPの適切な投与量はヒトの体重1kg当たり0.07mg~46mgである。

プロスタグランジンA受容体のアンタゴニストは、ヘム-オキシゲナーゼ活性を低下させるのに適切なさらなる薬剤である。

HO活性を減少させるための別の薬剤は、NOレベルを増加させる薬剤である。従

って、本発明の第2の局面の別の実施態様は、有効成分として、患者においてNOのレベルを増加させる物質を含む薬学的組成物である。この物質は、所望により、一酸化窒素合成酵素（NOS）に対する基質またはこの酵素の刺激物質である。NOSに対する公知の基質はL-アルギニンであり、そして公知のNOドナーはニトロプルシドナトリウムである。

本発明の別の実施態様によれば、体内のヘム・オキシゲナーゼのレベルを減少させる方法が提供され、この方法は炎症反応を低下させるのに有効な投与量のヘ

ム・オキシゲナーゼ阻害剤を投与する工程を包含し、例えば、単球およびマクロファージで見い出された誘導性ヘム・オキシゲナーゼを標的化する。

本発明のさらなる実施態様によれば、ヒト体内で炎症反応を制御する方法が提供され、この方法は、有効な投与量のヘム・オキシゲナーゼ阻害剤、例えば、単球およびマクロファージで見い出された誘導性ヘム・オキシゲナーゼを標的化する阻害剤の投与によって炎症反応を活性化する工程を含む。

この阻害剤は、任意の適切な様式（例えば、滅菌水、生理食塩水（滅菌））により、任意の適切な薬学的に受容可能なビヒクル中で投与され得る。約pH7と約pH8との間のpHを有する緩衝化等張水性溶液が適切である。凍結乾燥製剤も適切であり得る。凍結乾燥製剤は滅菌水で再構成して投与され得る。

本発明の別の実施態様によれば、炎症反応を増加させる方法が提供され（例えば、AIDSを患う個人に）、この方法は、ヘム・オキシゲナーゼのHSP32イソ型の存在（発現）をモニターし、正常レベルを上回って増加した場合、ヘム・オキシゲナーゼ阻害剤の有効投与量を投与し、それにより炎症反応を増加させる工程を含む。

投与量は一定期間にわたって投与され得る。しかしながら、現在使用される化合物の効果は、各投与量の投与24時間後にピークとなり、そして投与48時間後に減退するようである。

本発明のなおさらなる実施態様は、免疫抑制を処置するための医薬の製造における、ヘム・オキシゲナーゼ阻害剤の使用である。もう1つは、単球およびマクロファージの活性を増加させるための医薬の製造における、ヘム・オキシゲナー

ぜ阻害剤の使用である。

免疫抑制はまた、他の療法の副作用として引き起こされ得る（例えば、移植器官の拒絶を抑制するように設計された薬物による移植後免疫抑制）。拒絶はこれらの環境におけるT細胞の応答によって主として媒介され、従って、免疫抑制はT細胞活性の損傷を除去することである。しかしながら、単球およびマクロファージ活性の平行した損失（通常、数の減少による）も観察される。従って、本発明の第2の局面の別の使用は、単球およびマクロファージの選択的刺激である。

「選択的」により、これらの細胞の活性および/または数が、T細胞の活性およ

び/または数における任意の増加に対してより高い比率で増加することを示すことが意図される。

次に、本発明を図面を参照して特定の実施態様において説明する。

図1は、ラット胸膜腔にカラゲニン(carrageenin)を注射した2、6および24時間後における急性炎症の進展を示す（白四角—細胞滲出物、黒四角—全細胞、各時間でn=6）；

図2は、急性炎症の間の時間単位で表した時間に対するnmolビリルビン/60分/mgタンパク質としてのHO活性の測定を示す（各時間でn=6）；

図3は、ウェスタンブロット分析によるHSP検出を示す写真であり、24時間のところにピークがある；

図4は、ラット胸膜腔にカラゲニンを注射した各時間後における急性炎症の進展を示す（□滲出物容量、■全炎症細胞、n=10）；

図5は、カラゲニン胸膜炎の間の時間経過（時間）に対する炎症細胞のヘムオキシゲナーゼ（HO）活性を示し、この活性を、pmolビリルビン/mgタンパク質/時間（n=9）として表す（結果を、平均値±標準誤差平均値として表す。■末梢血単核細胞（PBMN）、□炎症細胞の時間経過）；

図6および図7は、ヘムオキシゲナーゼのイソ型についてのウェスタンブロット分析を示す：図6）HO-1についての炎症細胞ペレットの分析。各レーンは、2、6、12、24および48時間で採取した炎症細胞、脾臓ホモジネート（SP）、PBL（BL）、図7）HO-2についての炎症細胞ペレットの分析。各レーンは、2、6

、12、24および48時間で採取した炎症細胞、脳ホモジネート (BR)、PBL (BL)

；

図8～10は、ヘムオキシゲナーゼ1についての炎症細胞塗抹の免疫局在化を示し、単核細胞におけるヘムオキシゲナーゼ1タンパク質の増加した陽性染色が確認される：図8) 正常ウサギ血清 (コントロール)、図9) 6時間炎症細胞塗抹、図10) 48時間炎症細胞塗抹；

図11～16は、炎症およびH0活性に対するヘムオキシゲナーゼ (H0) モジュレーターの効果を示す：24時間における急性炎症に対するスズプロトポルフィリン二塩化物 (SnPP) の効果 (図11-滲出物容量、図12-細胞数)、24時間における急性炎症に対するフェリプロトポルフィリンIX二塩化物 (FePP) の効果 (図13-

滲出物容量、図14-細胞数)、24時間炎症細胞中のH0活性に対するSnPP (図15) およびFePP (図16) 投与の効果。炎症細胞は、前記ポルフィリンによる処理後に回収し、そして図5におけるようにH0活性を測定した ($n=6$)。* $P<0.05$ 、* $P<0.01$ および*** $P<0.001$ ；

図17および図18は、ラット脳および脾臓のヘムオキシゲナーゼ活性に対するNG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (L-NAME) の効果を示す、図17-脳ホモジネート、図18-脾臓ホモジネート (0.1、0.5、1、5または10mMのL-NAMEを反応混合物と共にインキュベートした。結果を、化合物を摂取しなかったコントロール (con) 群のパーセント活性として表す ($n=8$ 、*** $P<0.001$)。)

；

図19および図20は、ラット脳および脾臓のヘムオキシゲナーゼ活性に対するL-アルギニンの効果を示す、図19-脳ホモジネート、図20-脾臓ホモジネート。0.1、0.5、1、5または10mMのL-アルギニンを反応混合物と共にインキュベートした。結果を、化合物を摂取しなかったコントロール (con) 群のパーセント活性として表す ($n=8$ 、* $P<0.05$ 、*** $P<0.001$)；

図21および図22は、ラット脳および脾臓のヘムオキシゲナーゼ活性に対するD-アルギニンの効果を示す、図21-脳ホモジネート、図22-脾臓ホモジネート。0.1、0.5、1、5または10mMのD-アルギニンを反応混合物と共にインキュベ

ートした。結果を、化合物を摂取しなかったコントロール (con) 群のパーセントとして表す (n = 8) ; および

図23および図24は、ラット脳および脾臓のヘム・オキシゲナーゼ活性に対するニトロプルシドナトリウムの効果を示す、図23-脳ホモジネート、図24-脾臓ホモジネート。0.001、0.01、0.1、1、または10mMのニトロプルシドナトリウムを反応混合物と共にインキュベートした。結果を、化合物を摂取しなかったコントロール (con) 群のパーセントとして表す (n = 8、* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.001)。

実施例 1

以下の実施例において、本発明者らは、急性および慢性炎症におけるヘム・オキシゲナーゼの発現および可能な関与を調べた。ヘム・オキシゲナーゼ 1 の高度

に誘導可能なイソ型は、最近HSP (HSP32) として分類されている。これは、ヘムタンパク質の補欠分子団の異化作用における律速酵素である。この反応の主要産物であるビリルビンは、強力なフリーラジカルスカベンジャーであって、そして細胞が自分自身をフリーラジカル損傷から保護する内因性メカニズムを表し得る。一酸化炭素 (CO) もまた、この反応によって生成する。一酸化窒素 (炎症の主要メディエーター) に対する構造的類似性、および両分子のヘムタンパク質を結合する能力のため、炎症におけるCOの役割は、本発明者らが回答を求める興味ある疑問を生起した。

この実施態様において、急性炎症のラット・カラゲニン胸膜炎モデルを用いて、炎症細胞におけるHSP32の発現および活性を測定した。炎症のマーカー、細胞滲出物および細胞数は、2、6 および12時間にわたって漸次増加し、24時間でピークとなり、そして48時間で減退した。炎症は、初期の時点において多形核白血球 (PMN) によって支配され、炎症が進行するにつれて単球集団が増加した。単球の増加は、ウェスタンブロット分析によって測定されたHSP32タンパク質レベルの増加と関連した。それは、24および48時間で強く標識されたバンドであった。免疫組織化学により、HSP32タンパク質が単球中に存在したことが確認された。ヘム・オキシゲナーゼ (HO) 活性をまた、2、6 および24時間でアッセイした

。後者の時点は、活性を示した唯一の時点であった。次いで、ヘミン（HSP32発現の誘導物質）およびスズプロトポルフィリンIX（H0活性を阻害するヘムの合成アナログ）でH0活性を調節する効果を調べた。誘導物質または阻害剤は、コントロールと比較して6時間で炎症に対して有意な効果を有しなかった。しかし、24時間で、この阻害剤は、細胞滲出物を135% ($p < .001$, Mann-Whitney) だけ有意に増加させ、他方、HSP32の誘導物質は、細胞滲出物および細胞総数を、各々、83% ($p < .001$) および50% ($p < .001$) だけ減少させた。従って、これらの化合物の効果は、急性炎症のこのモデルにおけるHSP32の一時的発現に対応する。

材料および方法

動物および薬物

雄ウィスターラット200±20グラム(Tuck & Sons Ltd., Essex, UK)を炎症のために用いた。動物に、炎症の18時間前に静脈内注射による15mg/kgフェリプロ

トポルフィリンIX塩化物(FePP)、あるいは炎症誘導の18時間および誘導時に皮下注射による40 μ mol/kgスズプロトポルフィリン二塩化物(SnPP)の2投与のいずれかを投与した(ポルフィリンは、Porphyrin Products Inc., Logan, Utahから入手した)。薬物は、0.1N NaOH中で調製し、そして生理食塩水と1:1で混合し、次いでこれらをpH7.4に調整した(薬物ビヒクル)。注射した合計容量は0.2 mlであった。コントロール動物は、ビヒクルのみを摂取した。

胸膜炎の誘導

カラゲニン胸膜炎をラットにおいて誘導し、そしてTomlinsonらによって既に記載されているように、細胞ペレットを調製した。

H0活性

ビリルビンの生成を定量することによって、細胞ペレット中のH0活性をポストミトコンドリア上清(post mitochondrial supernatant)中で測定し(Jollie DRら、Arch Biochem Biophys, 1985, 240, 51-59頁)、ビリベルジンレダクターゼをラット肝サイトゾル(3mg/ml)で置き換えた。タンパク質は、標準としてBSAを用い、Bradford法によって見積もった。

ウェスタンブロット分析

1%トリトンX100を含有するプロテアーゼ阻害緩衝液の添加によって細胞ペレットを溶解し、1:1の比率にてゲルローディング緩衝液 (Tris、50mM; SDS、10%; グリセロール、10%; 2-メルカプトエタノール、10%プロモフェノールブルー、2mg/ml) と共に煮沸し (10分間)、そして10,000 gで10分間遠心分離した。上清のタンパク質濃度を上記のように測定し、そして各サンプルについて総タンパク質等量 (20 μ g) を、Laemmli緩衝液系を用い、10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドミニゲル (Hoefer;Staffordshire,UK) 上で分離し、そしてポリビニリデンジフルオリド膜 (Millipore, Hertfordshire, UK) に転写した。非特異的IgGを5%乾燥乳タンパク質でブロックし、そしてHSP32に対するポリクローナル抗体の1:1000希釈物 (Stressgen Crop., Victoria, Canada) と共にインキュベートした。アルカリホスファターゼ増幅キット (Sigma Co., Poole, UK) でバンドを検出し、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) -5-ブロモ-4-クロロ-3-インドニルホスフェート (BCIP) で発色させた。虹色マ

ーカー (rainbow marker) および予め染色した青色タンパク質マーカーを分子量測定のために使用した。

統計学

結果を、平均値±標準誤差平均値として表す。統計解析は、Mann-Whitney U-テストで行い、 <0.05 のP値を有意と見なした。

図1は、胸膜腔における炎症の間の滲出物容量および細胞数の進展を示す; これらとともに、カラゲニンの注射後24時間で共に最大であった。滲出物細胞ペレットにおけるHO活性の有意な増加 (図2)、およびウェスタンブロット分析によるHSP32タンパク質の検出 (図2、および図3 (写真)) は、炎症におけるこのピークと一致した。次いで、カラゲニン炎症に対するHO阻害剤SnPPおよび誘導物質FePPの効果調べた (表1)。6時間での滲出物容量および細胞数は、HO阻害剤または誘導物質での前処理によって有意には変化しなかった。しかし、炎症開始の24時間後、SnPPは、ビヒクルコントロールと比較して滲出物容量を128%だけ増加させ ($P<0.001$)、一方、FePPは、ビヒクルコントロールと比較して滲

出物容量を73%、および細胞数を50%だけ減少させた（共に $P < 0.001$ ）。

急性炎症に対するヘム-オキシゲナーゼ阻害剤スズプロトポルフィリン二塩化物（SnPP）および誘導物質フェリプロトポルフィリンIX塩化物（FePP）の効果を調べた。処置動物は、炎症の誘導の18時間および0時間前に $40 \mu\text{mol/kg}$ SnPPの2投与量（皮下）、または炎症18時間前に 15mg/kg FePPの1投与量（静脈内）のいずれかを受けた。処置動物を、適切な経路でビヒクルのみを摂取させたコントロール動物と比較した。*** $P < 0.001$

これらの結果は、急性炎症のモデルからの炎症細胞におけるHSP32発現およびHO活性の誘導を初めて示すものである。上記で報告したHO活性の増加は、胸膜腔におけるマクロファージ集団の増加を伴う。免疫組織化学により、このモデルでは、炎症性マクロファージの強い陽性免疫反応性が示されたが、HSP32の末梢単球では示されなかった（データは示さず）。HO活性を予備刺激または阻害する効果は、24時間において、各々、有意に減少または増加した。これは、HOモジュレーターの主要な効果が24時間における炎症性マクロファージに対するものであり、炎症部位で多形核白血球が支配的になる6時間では有意な効果は見られなかった

ことを示す。本発明によって達成されたHO活性における増加は、慢性炎症性疾患の処置のための新規な療法を表し、逆に、活性の減少は、損なわれた炎症反応を有する個体で有益であろう。

実施例 2

方法

薬物投与

動物は、炎症誘導の18時間前および誘導時に、3、10または $30 \mu\text{mol/kg}$ SnPP（HO阻害剤）またはビヒクルコントロールのいずれかの2投与量を摂取した。動物は、炎症誘導の18時間前に、3、10または $30 \mu\text{mol/kg}$ FePP（HO誘導物質）またはビヒクルコントロールいずれかの1投与量を摂取した（ $n = 9$ ）。

胸膜炎の誘導

雄ウィスターラット200+20グラムをハロタンで麻酔し、そして0.9% NaCl中

の1%カラゲニン溶液の150 μ lを胸膜腔に注射した。1mlのプロテアーゼ阻害緩衝液での胸膜洗浄による、刺激原の注入後2、6、12、24および48時間後に滲出物を収集した。プロテアーゼ阻害緩衝液は、10mMリン酸緩衝液(PBS) pH7.3中に、クエン酸三ナトリウム3.15%、フッ化フェニルメチルスルホニル1mM (Sigma Chemical Co., Poole, UK)、ペプスタチンA 1.5mM(Sigma)およびロイペプチン0.2mM (Sigma)を含有する。血液汚染がある滲出物はどれも、採用しなかった。細胞を、コールターカウンター、モデルDN (Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)を用いて計数した。各試料を800gで10分間遠心分離し、そして得られた細胞ペレットを後記するように調製した。

免疫組織化学

末梢血および滲出物細胞のサンプルを、ポリーレージン被覆スライドに塗抹し、そして風乾した。免疫標識または組織学的染色に先立って、0.1Mリン酸緩衝液中の4%パラホルムアルヒドで塗抹を1時間固定した。内因性ペルオキシダーゼをメタノール中の0.3% H₂O₂でクエンチし、そして切片をPBS中の0.1%トリトンX100で洗浄した。PBS中で実質的にグロブリンを含まない0.1%BSA中のNGS 1:50を用い、IgGの非特異的結合をブロックした。この切片を、4℃で、ポリ

クローナル抗H0-1 (1:200) またはポリクローナル抗H0-2 (1:1000) と共に一晩インキュベートし、洗浄し、そしてビオチン化ヤギ抗ウサギ二次抗体と共にさらに30分間インキュベートした。ベクタステイン (Vectastain) ABC西洋ワサビペルオキシダーゼ (Vector Labs, Peterborough, UK) と共にさらに30分間インキュベートした後、0.05Mトリス緩衝液(pH7.6)中の基質、0.05%ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド(Sigma)を適切な時間(5~10分間)添加した。この結果、茶色に標識する陽性の免疫反応性が得られた。一次抗血清を、陰性コントロールとして、NGSと置き換えた。日常的な組織学的染色(ヘマトキシリンおよびエオシン)を用いて、形態学的観察結果が確認された。

統計学

結果を、(n回)実験の、平均値±標準誤差平均値として表す。統計解析は、

スチューデントの対立 t 検定 (Student's unpaired t test) で決定され、 <0.05 の P 値を有意と見なした。

ヘム-オキシゲナーゼアッセイ

HO活性を、Sierra ESら, Anal. Biochem. 1992; 200:27-30によって既に記載されているように評価する。プロテアーゼ阻害緩衝液中、10秒間の超音波処理によって細胞を溶解する。既に記載されているようにヘム-オキシゲナーゼをアッセイする。反応混合物 ($15\mu\text{l}$) は、 $11.2\mu\text{M}$ [^{14}C] ヘム (比活性 54Ci/mol)、 1mM NADPH、 2mM グルコース-6-リン酸、 0.1 ユニットのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、 3mg/ml 肝臓サイトゾルタンパク質および $50\sim 100\mu\text{g}$ のサンプルタンパク質からなる。ヘムの添加によって反応を開始し、 37°C で30分間インキュベートし、そして過剰の冷ヘムおよびビリルビンの添加、続いて氷上に置くことによって停止した。 $2\mu\text{l}$ の反応混合物をシリカゲル薄層クロマトグラフィシート上に2回スポットする。クロロホルム：酢酸の20：1希釈を用い、クロマトグラムを展開する。ヘムおよびビリルビンに対応するスポットを切り出し、そして 10ml のシンチレーション流体に入れて計数する。タンパク質測定は、Bradford法 (Bradford MMら, Anal. Biochem. 1976; 72:248-254) によって行い、BSAをタンパク質標準として使用した。活性を、 pmol ビリルビン/ mg タンパク質/時間として表す ($n=9$)。結果を、平均値±標準誤差平均値として表す。

結果

ラットの胸膜腔へカラゲニンを注射した結果、急性胸筋炎が発生し、これは、炎症細胞数および滲出物容量によって評価されるように、24時間で最大であった (図4)。48時間で、炎症病巣は実質的に消散し、細胞数および滲出物容量は、炎症が最大に観察されたレベルの、各々、25%および11%に低下した。炎症の初期の部分は、多形核細胞 (PMN) の胸膜腔への流入によって特徴付けられ、24時間および48時間で存在する単核細胞 (MN) の割合の増加が起こった [表2]。HO活性は、炎症が進行するにつれて劇的に増加し、最大活性は、炎症が消散しつつあるとき (図4) に記録され、そのとき、MNが炎症病巣で支配的であった。ウェスタンブロット分析により、HO-1タンパク質レベルに劇的な増加があったこと

が確認された（データは示さず）。炎症細胞塗抹において、H0-1免疫反応性は、染色をほとんどまたは全く示さなかったPMNと共に単核細胞に特異的に局在化していた。陽性に染色された細胞の数は、炎症が進行するにつれて増加した（図8～10）。免疫反応性が単核細胞に局在化する同様の染色プロフィールが、H0-2に対するポリクローナル抗体によって観察された。

これらの結果は、炎症細胞におけるH0発現および活性の増加があることを示した。増加したH0活性が組織保護に関係するのみならず急性炎症の消散に関与する否かを調べるために、本発明者らは、H0阻害剤、スズプロトポルフィリン（SnPP）を用い、カラゲニン注射の18時間前および注射時に皮下投与し、そしてH0誘導物質、フェリプロトポルフィリンIX塩化物（FePP）を用い、炎症誘導の18時間前に皮下投与した（Maines MDら、FASEB J. 1988; 2:2557-2568）。

カラゲニンの注射6時間後のビヒクルコントロール、炎症のPMN相と比較して、SnPPまたはFePPの処置はいずれも、炎症病巣に対して効果を有しなかった（データは示さず）。しかし、MNが支配的となったカラゲニンの注射24時間後、SnPP（H0阻害剤）を摂取した動物は炎症滲出物において用量依存的増加を示し、 $3 \mu\text{mol/kg}$ SnPPを投与した動物は、ビヒクルコントロールと比較して、滲出物容量が70%だけ増加した（図11）。最大用量のSnPP（ $30 \mu\text{mol/kg}$ ）は滲出物容量をさらに増加させたが、炎症細胞数は減少したこと（図12）は注目される。後者は毒性効果であると説明されるであろう。対照的に、FePP（H0誘導物質）を摂取した

動物は、炎症細胞数および滲出物容量の用量依存的抑制を示した（図13および図14）。使用したすべての投与量は炎症を有意に減少させ、FePPの最低用量（ $3 \mu\text{mol/kg}$ ）は、ビヒクルコントロールと比較して、炎症細胞数および滲出物容量を、各々、90%および55%だけ減少させた。

達成された抑制の程度は、このモデルにおける通常の抗炎症剤またはステロイドの最適用量で観察されたものよりも大きい。H0活性用の炎症ペレットの分析により、SnPPでのH0活性の低下およびFePPでの処理後の増加が確認された（図15および16）。これらの知見は、H0活性が急性炎症の消散において重要であるという考えを支持する。現象は用量依存的であり、そしてH0が発現される場合、ポルフ

イルンの逆効果が観察されるのみであるので、データはまた、SnPPおよびFePPの作用の主要な様式は、H₂O₂活性の調節を介するもので、他のメカニズムを介するものではないことを示唆する。

結論として、本実施例の知見は、急性炎症の消散におけるH₂O₂の直接的関与を意味する。MN、慢性炎症と密接に関連する細胞型におけるH₂O₂の存在は、慢性炎症反応のモジュレーターとしてのこの酵素の概念、従って、本発明の種々の局面による治療のための標的を支持する。

実施例3

方法

雄ウィスターラットの脳および脾臓（160±20 g, Tuck Co., UK）を、プロテアーゼ阻害緩衝液（10mMリン酸緩衝化生理食塩水（pH7.3）中のフッ化フェニルメチルスルホニル 1 mM、ペプスタチン A 1.5mMおよびロイペプチン0.2mM）中で、ガラスホモジナイザーを用いてホモジネートした。Bradford法によってタンパク質測定を行い、ウシ血清アルブミンをタンパク質標準として用いた。

一酸化窒素合成酵素活性を、シトルリンアッセイによって測定した。そして、pmolシトルリン/mgタンパク質/30分間としてデータを計算した(Vane, J.R.ら(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91,2046-2050)。

ヘムオキシゲナーゼ活性を、以前の記載のようにアッセイした(Sierra, E.E.ら(1992)Analytical Biochem. 200, 27-30)。

簡単に述べると、15 μ lの反応混合物は、11.2 μ M [¹⁴C]ヘム（比活性54Ci/mol）、1 mM NADPH、2 mMグルコース-6-リン酸、0.1ユニットのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、3 mg/ml肝臓サイトゾルタンパク質、100~50 μ gのサンプルタンパク質および適切な濃度のテスト薬物（L-アルギニン、D-アルギニン、NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル（L-NAME）またはニトロプロシドナトリウム）からなった。テスト薬物を含有する反応混合物を、ヘムの添加によって反応を開始する前に、37℃で15分間平衡化させた。過剰の冷ヘムおよびビリルビンの添加によって30分後に反応を終止させ、そして氷上に置いた。2回の2 μ lの添布によって、反応混合物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー

シート上にスポットした。すべてのサンプルを二連で操作した。クロロホルム：酢酸の20：1希釈を用いて、クロマトグラムを展開した。ヘムおよびビリルビンに対応するスポットを切り出し、10mlのシンチレーション流体に入れて、計数した。データは、pmol生成ビリルビン/mgタンパク質/時間として計算した。

生データの統計解析は、スチューデントの対立t-検定を用いて行った。結果を平均値±標準誤差平均値で表し、 $P < 0.05$ を有意と見なした。

結果

本発明者らのアッセイ系によって測定されるように、ラット脳のホモジネートは、HOおよびNOSの活性を共に含有していた。対照的に、ラット脾臓ホモジネートは、2倍のHO活性を有していたが、NOS活性を欠いていた（表3）。NOS阻害剤（L-NAME）の添加の結果、脳のHO活性の用量依存的増加が生じ、5 mM L-NAMEは80%だけ活性を有意に増加させた（図17）。逆に、L-アルギニン（NOS基質）の脳ホモジネートへの添加の結果、HO活性の用量依存的低下が生じた（図19）。使用したL-アルギニンの最大濃度（10mM）は、HO活性を75%だけ低下させた。NOシによって基質として利用され得ないL-アルギニンのエナンチオマーであるD-アルギニンは、脳のHO活性に対して有意な効果を有しなかった（図21）。

脳のHO活性とは異なり、脾臓のHO活性は、L-NAME、L-アルギニンまたはD-アルギニンの添加によって変化しなかった（それぞれ図18、20および22）。しかし、NOドナーのニトロプルシドナトリウムの添加の結果、脾臓および脳のホモジネートの双方においてHO活性の用量依存的低下が生じた（図23および24）。10mMニトロプルシドナトリウムの添加の結果、脳および脾臓のホモジネートのHO活性は、それぞれ、75%および80%の低下が生じた。

これらの結果は、NOSによって生成したNOがHO活性を阻害することを示す。通常の生理学的条件下で脳に存在するNOSおよびHOのイソ型は、各々、酵素の構成型形態、cNOSおよびHO-2であり（Bredt, D.S.ら, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 682-685、およびVerma, A.ら, (1993) Science 259, 381-384）；一方、正常の生理学的条件下の脾臓は、HOの誘導型形態のみを含有する（Maines, M.D. (1988) FASEB. J. 2, 2557-2568）ことに注目するのは重要である。

HO活性の阻害剤およびNOドナーの効果は、ラット脳のホモジネートで調べられている。この場合、NOSおよびHOの双方の内因性活性は高く、そしてラット脾臓では、脳よりも、HOは高いが、NOS活性は低い。

本発明者らは、一酸化窒素の基質、D-アルギニンではなく、L-アルギニン(0.1~10mM)が、ラット脳のホモジネートでヘム-オキシゲナーゼ活性を低下させたこと、およびアルギニンアナログのL-NAME(0.1~10mM)が、同じ組織で活性を増加させたことを見出した。内因性一酸化窒素活性が脳よりも低い脾臓ホモジネートにおいて、これらの化合物は効果を有しなかった。一酸化窒素ドナーのニトロプルシドナトリウム(0.001mM~10mM)は、脳および脾臓の双方においてヘム-オキシゲナーゼ活性を低下させた。

本発明者らは、NOSが誘導される条件において、HO活性のNO調節の効果が増幅されると考える。さらに、NOは、ヘム含有酵素シクロオキシゲナーゼとのその相互作用によって、重要な炎症メディエーターであるプロスタノイドの産生を調節することが示唆される。本発明者らは、炎症のモデルにおけるHOの抗炎症の役割を示してきた。本発明者らは、NOSおよびHOは炎症における相互的調節効果を有し、その効果が本発明の種々の局面の基礎であると提案する。

表 1

処置群	滲出物容量 (ml)	細胞総数 10^8
6 時間		
ビヒクル皮下注射 (n=27)	1.26 \pm 0.10	72 \pm 7
SnPP皮下注射 (n=26)	1.59 \pm 0.12	67 \pm 6
ビヒクル静脈内注射 (n=23)	1.29 \pm 0.15	69 \pm 8
FePP静脈内注射(n=26)	0.99 \pm 0.11	50 \pm 8
24時間		
ビヒクル皮下注射 (n=29)	0.79 \pm 0.12	63 \pm 6
SnPP皮下注射 (n=24)	1.80 \pm 0.21	58 \pm 6
ビヒクル静脈内注射 (n=22)	1.37 \pm 0.16	90 \pm 6
FePP静脈内注射(n=25)	0.37 \pm 0.07	45 \pm 6

表 2

時間	細胞型	全細胞数の%*	HO-1 [#] についての% + ve	HO-2 [#] についての% + ve
2 時間	PMN	86	0	0
	MN	14	25	45
6 時間	PMN	> 99	0	0
	MN	< 1	N. D.	N. D.
12時間	PMN	> 99	0	0
	MN	< 1	N. D.	N. D.
24時間	PMN	62	0	0
	MN	38	36	41
48時間	PMN	30	0	0
	MN	70	89	46

炎症細胞塗抹の免疫細胞化学分析

*炎症細胞塗抹中の多形核細胞（PMN）および単核細胞（MN）の相対パーセント。

[#]ヘム-オキシゲナーゼイソ型につき陽性で、存在するPMNおよびMNのパーセント。

N. D. 分析に不十分で存在する細胞

表 3

	脳 n = 8	脾臓 n = 5
ヘム-オキシゲナーゼ活性 pmolビリルビン/mgタンパク質/30分	40 ± 4	85 ± 5
一酸化窒素合成酵素活性 pmolシトルリン/mgタンパク質/30分	358 ± 78	2.38 ± 1

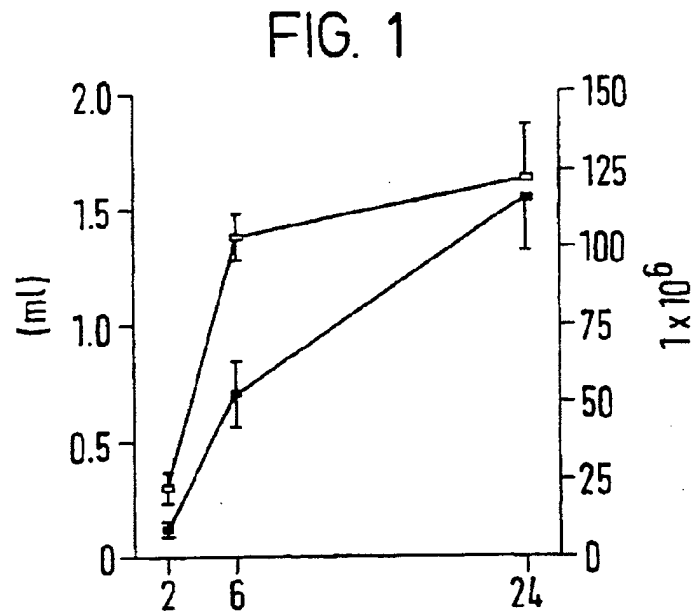
ラット脳および脾臓のホモジネート中のヘム-オキシゲナーゼおよび一酸化窒素合成酵素活性。平均値 ± 標準誤差平均値

従って、本発明による炎症の制御が、本発明の実施態様において、単独あるい

はコントロールのII0と組み合わせて、(1) II0の制御、または(2) 一酸化窒素のレベルの制御によって、達成される。

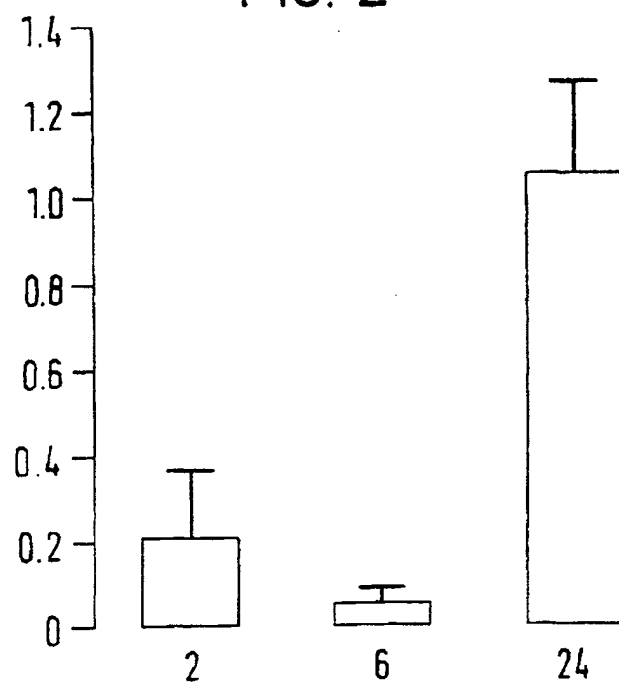
多くの変形が、本発明の範囲を逸脱することなく本発明の実施態様になし得るので、本明細書に含まれるすべての物質は、本発明の例示と解釈されるべであり、限定的意味ではないことが意図される。

【図1】



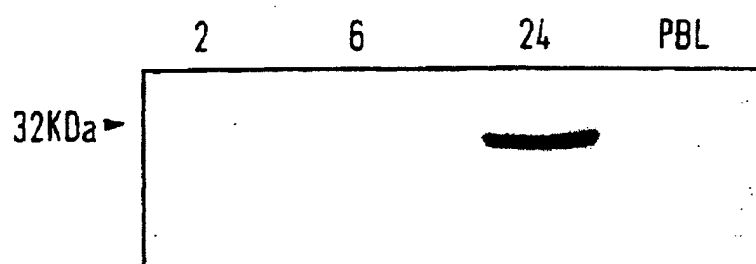
【図2】

FIG. 2

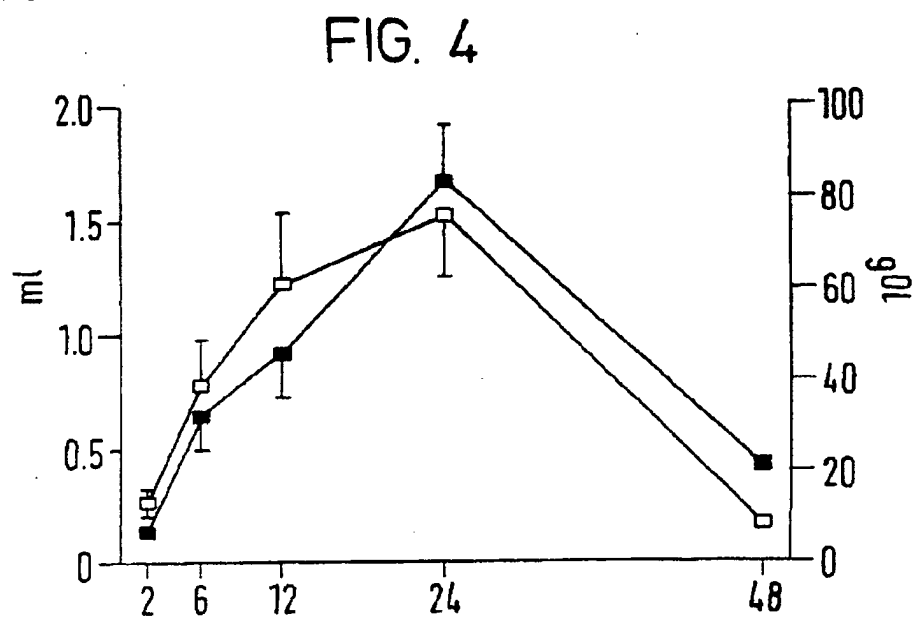


【図3】

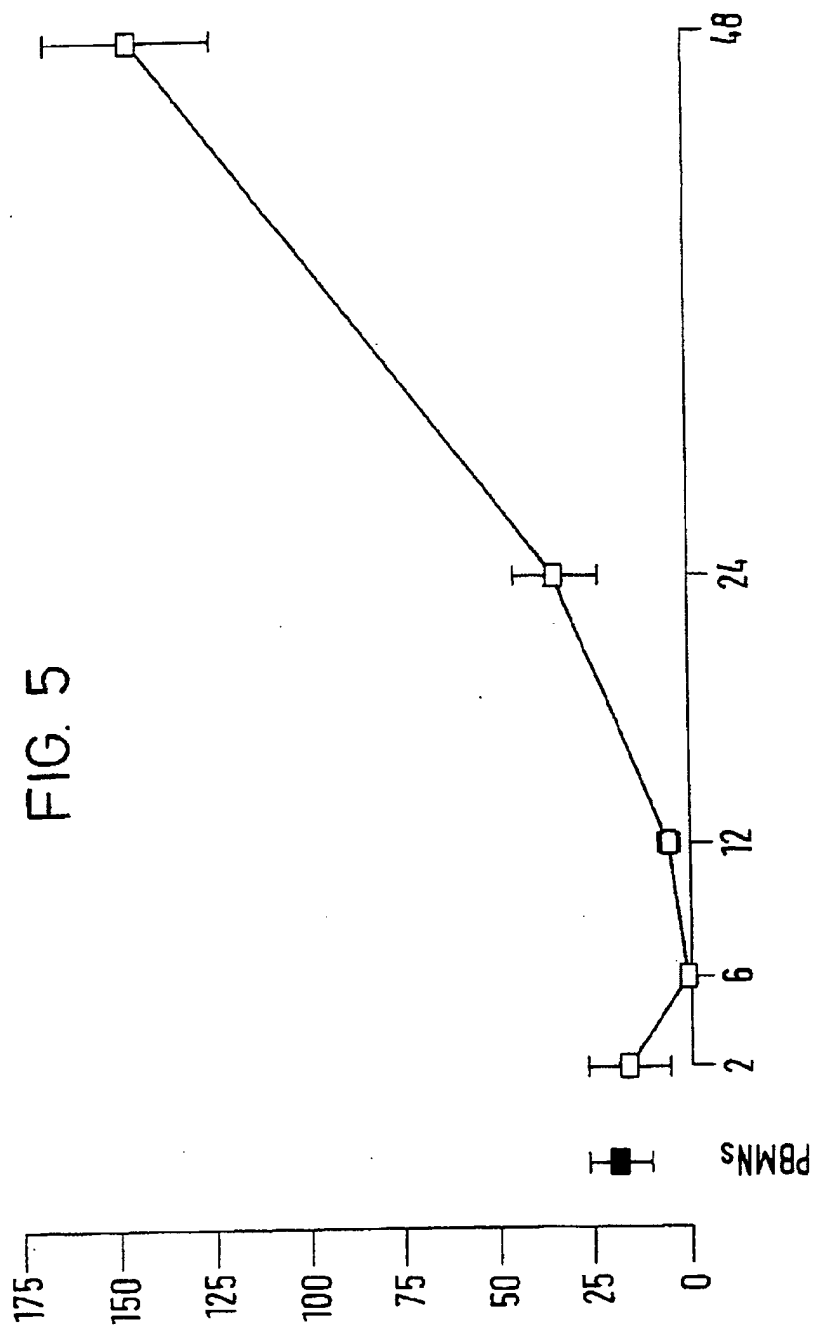
FIG. 3



【图 4】

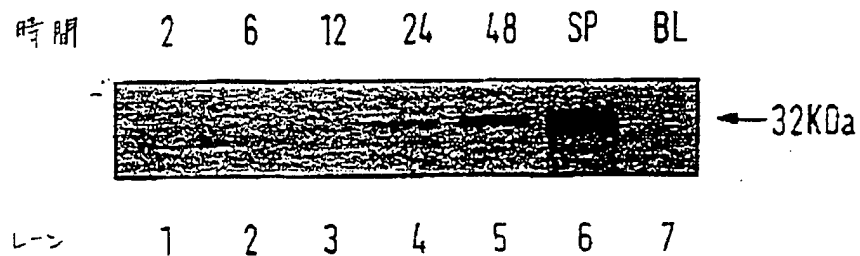


【図5】



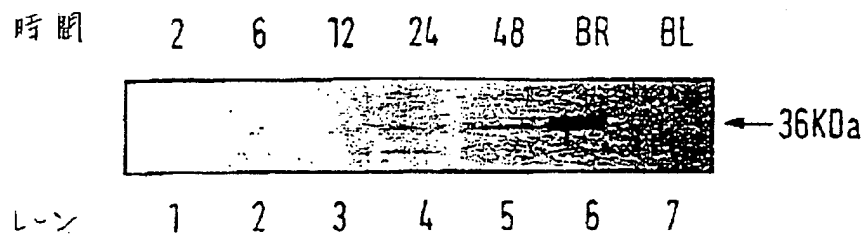
【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



【図8】



FIG. 8

【図9】

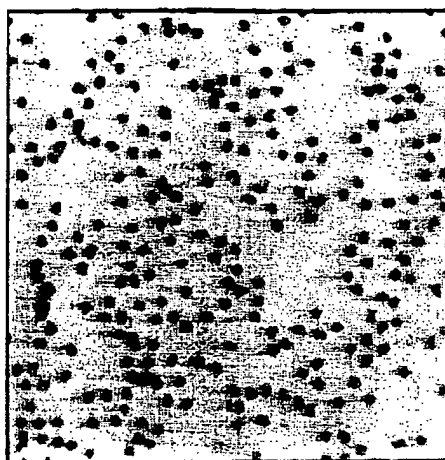


FIG. 9

【図10】

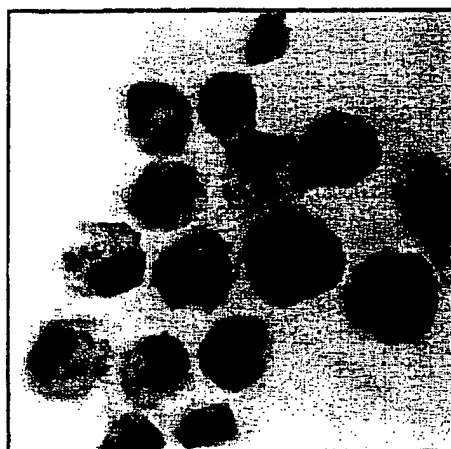
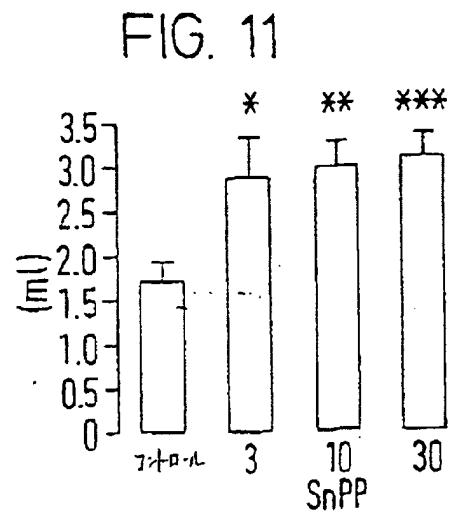
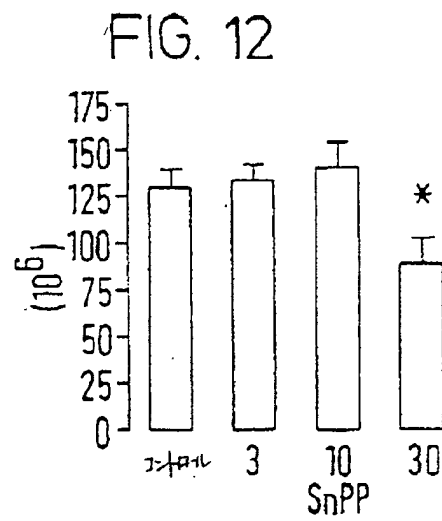


FIG. 10

【図11】

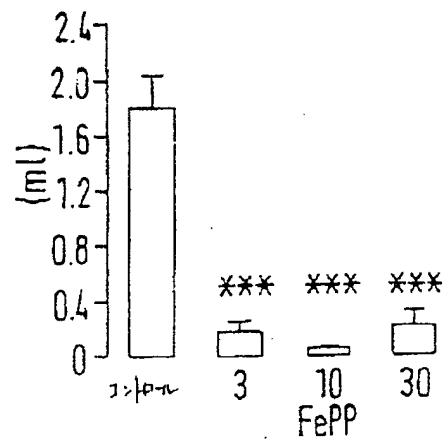


【図12】



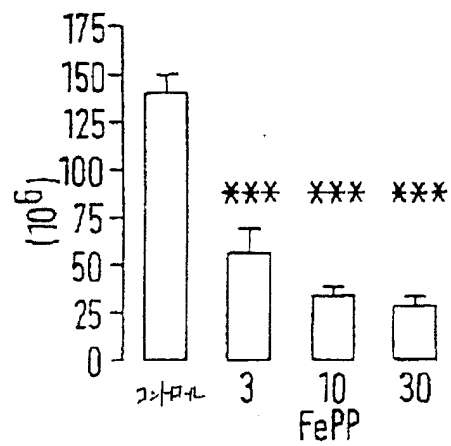
【図13】

FIG. 13



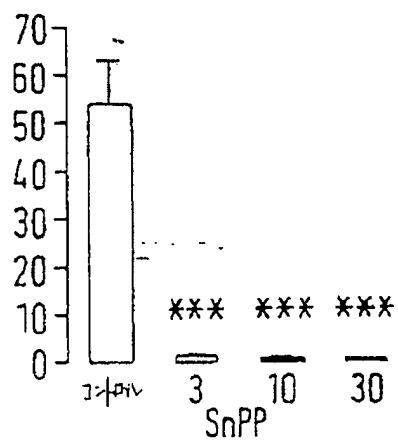
【図14】

FIG. 14



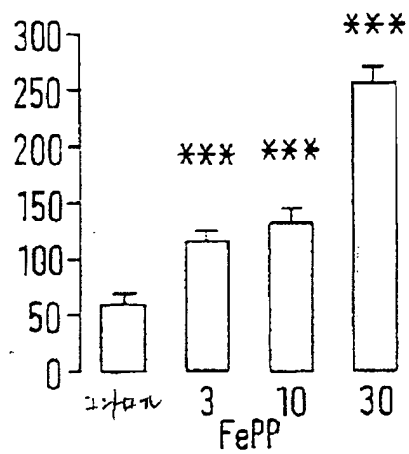
【図15】

FIG. 15



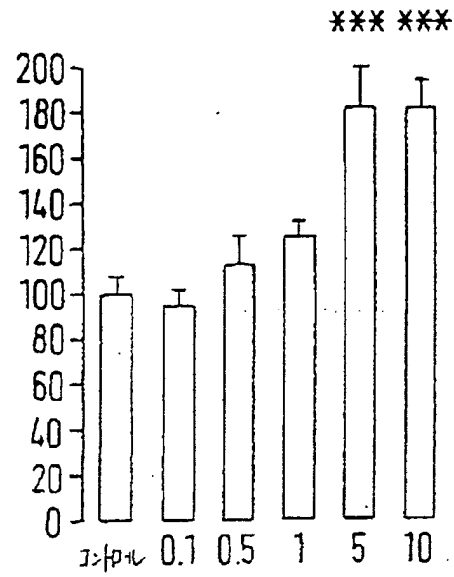
【図16】

FIG. 16



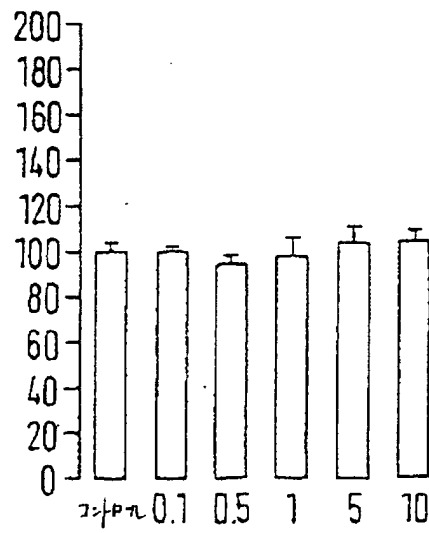
【図17】

FIG. 17



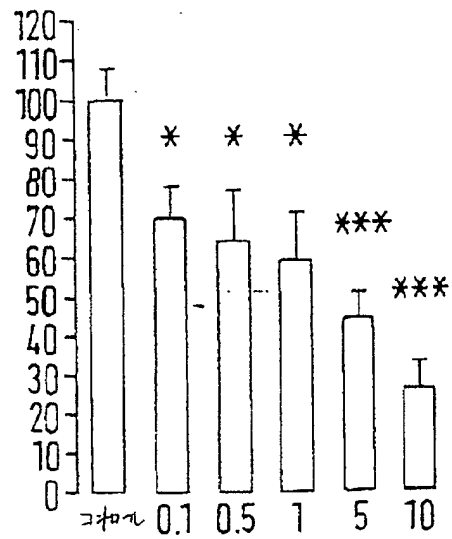
【図18】

FIG. 18



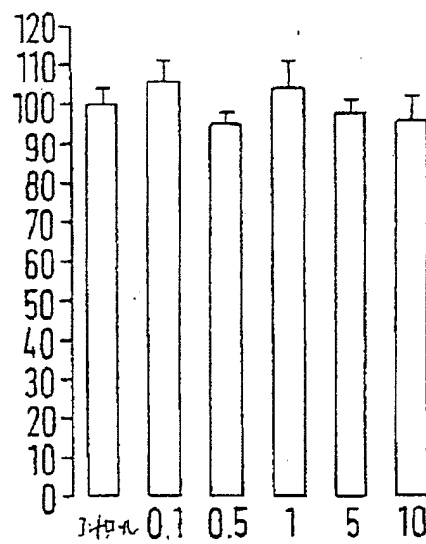
【図19】

FIG. 19



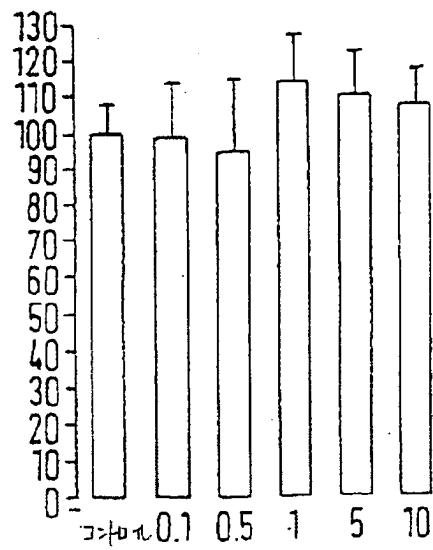
【図20】

FIG. 20



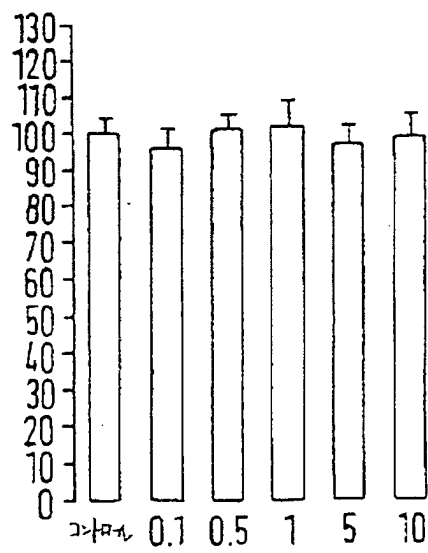
【図21】

FIG. 21



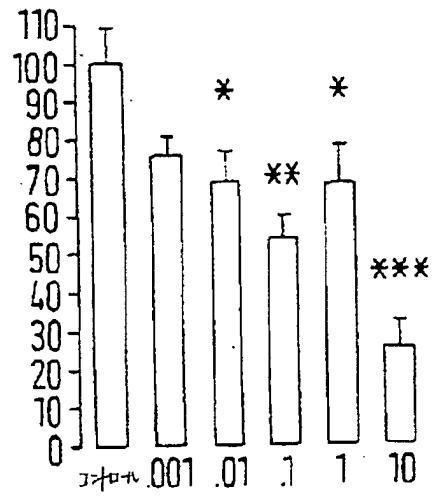
【図22】

FIG. 22



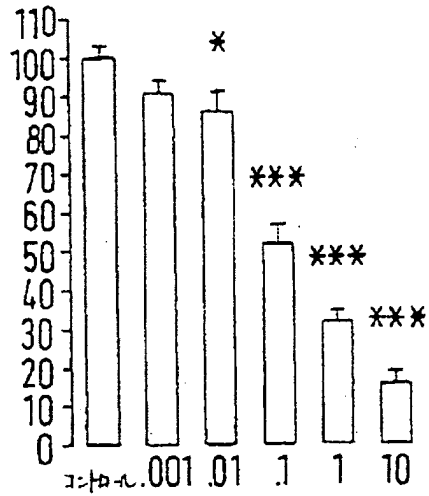
【図23】

FIG. 23



【図24】

FIG. 24



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		International Application No.
IPC 6 A61K31/00 A61K31/40 A61K31/557 A61K31/68 A61K31/195 A61K33/26		PCT/GB 95/02249
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEM J., vol. 279, no. pt 3, 1991 pages 891-894, L. CANTONI ET AL. 'Interleukin-1 and tumor necrosis factor induce hepatic haem oxygenase. Feedback regulation by glucocorticoids.' see the whole document	1,2,6, 21-23
X	GB,A,2 263 111 (S.C.R.A.S) 14 July 1993 see page 2 - page 3	1,4-6
X	WO,A,93 13055 (WELLCOME FOUNDATION) 8 July 1993 see page 5; claim 1	1,4-6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'D' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art 'R' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 March 1996		29.04.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-1016		Authorized officer Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 95/02249

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 13252 (HEMOGEN INC.) 23 June 1994 see page 3; claims ---	1,2,6,7, 21-23
X	WO,A,92 18112 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORP.) 29 October 1992 see claims ---	19,20
X	WO,A,93 07114 (USA DEPT. HEALTH AND HUMAN SERVICES) 15 April 1993 see page 25; claims ---	19,20
A	WO,A,91 04667 (ROCKEFELLER UNIVERSITY) 18 April 1991 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB95/02249

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1 (partially), 2-10, 21-24
2. Claims 1 (partially), 11-20, 25-29

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest:

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

LACK OF UNITY OF INVENTION

The aim of the present application is to provide a novel use for known compounds. This use consists of the alteration of the activity or amount of heme-oxygenase in order to control inflammation. Both induction and inhibition of heme-oxygenase can be useful within the inventive concept.

As can be learned from Biochem. J. 1991.279/pt.3, pages 891-4, heme-oxygenase can be induced in vivo by the administration of interleukin-1 or TNF in inflammatory conditions.

The conclusion is that the alteration of heme-oxygenase activity in the sense of the invention is not novel. This means there is no single unifying concept linking the different aspects of the invention as a result of which the application lacks unity of invention a posteriori.

In the present application no further technical feature(s) can be distinguished that can be regarded as a "special technical feature" involved in the technical relationship among the different inventions.

Consequently, the present application lacks unity of invention, and the different solutions not belonging to a common inventive concept are identified as the different subjects listed in the communication pursuant to Article 17(3)(a)PCT. Each of the inventions listed is a distinct invention, characterised by its own special technical feature, defining the contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

Searching these different subjects would have caused major additional searching efforts. Only the first subject was searched.

1. Claims: 1 (partly), 2-10, 21-24 Use of a compound to increase or induce heme-oxygenase levels or activity for the control of inflammation
2. Claims: 1 (partly), 11-20, 25-29 Use of a compound to reduce heme-oxygenase levels or activity for the control of inflammation

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 95/02249

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
GB-A-2263111	14-07-93	AT-A- 256092	15-10-95
		AU-B- 664399	16-11-95
		AU-B- 3049892	08-07-93
		BE-A- 1006227	14-06-94
		CA-A- 2085555	05-07-93
		CH-A- 685629	31-08-95
		DE-A- 4244539	08-07-93
		ES-A- 2052452	01-07-94
		FR-A- 2685869	09-07-93
		FR-A- 2685916	09-07-93
		GR-B- 1001443	30-12-93
		IT-B- 1256761	15-12-95
		JP-A- 5286916	02-11-93
		LU-A- 88208	15-04-93
		NL-A- 9300001	02-08-93
		NZ-A- 245499	26-07-95
		PT-A- 101165	28-02-94
		SE-A- 9203825	05-07-93
		US-A- 5360925	01-11-94
		US-A- 5480999	02-01-96
		ZA-A- 9210080	02-08-93
WO-A-9313055	08-07-93	AU-B- 3169293	28-07-93
		EP-A- 0618898	12-10-94
		HU-A- 70502	30-10-95
		JP-T- 7502512	16-03-95
		ZA-A- 9210018	23-06-94
WO-A-9413252	23-06-94	AU-B- 5747294	04-07-94
		CA-A- 2151148	23-06-94
		EP-A- 0673236	27-09-95
WO-A-9218112	29-10-92	EP-A- 0581856	09-02-94
		JP-T- 6506690	28-07-94
		US-A- 5455279	03-10-95
		US-A- 5234956	10-08-93
WO-A-9307114	15-04-93	AU-B- 2669092	03-05-93
		CA-A- 2119572	15-04-93
		EP-A- 0605622	13-07-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int: oral Application No

PCT/GB 95/02249

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WD-A-9307114		JP-T- 7502265	09-03-95
		US-A- 5366997	22-11-94
WD-A-9104667	18-04-91	US-A- 5010073	23-04-91
		AU-B- 634299	18-02-93
		AU-B- 6544090	28-04-91
		CA-A- 2042576	06-04-91
		EP-A- 0446340	18-09-91
		JP-T- 4502019	09-04-92

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

A 6 1 K 45/00

識別記号

A C D

A C F

F I

A 6 1 K 45/00

A C D

A C F

(81) 指定国

EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (KE, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, M W, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN

(72) 発明者 モワー, アドリアン リチャード

イギリス国 アイジー 1 1 エイチジー

エセックス, イルフォード, ウィンドソー

ロード 101

(72) 発明者 ウィロビー, デレック, アルバート

イギリス国 エヌ12 0 ジェイエル ロン

ドン, フィンチリー, ボウ レーン 83